第 44 卷 第 2 期
2001 年 5 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.44, No.2
May, 2001

棉铃虫不同发育阶段微粒体 P450 酶系组成和活性的比较

邱星辉，李 薇，冷欣夫

（中国科学院动物研究所，农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室，北京 100080）

摘要：比较了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 6 龄幼虫、蛹、成虫微粒体 P450 单加氧酶系组成及其活性。P450 含量在 6 龄幼虫中肠＞（脂肪体＝蛹）＞成虫，NADPH-细胞色素还原酶在幼虫中肠＞幼虫脂肪体＞蛹＞成虫；6 龄幼虫脂肪体微粒体与蛹脂肪体微粒体 P450 含量相近，但 NADPH-细胞色素还原酶活性前者是后者的 4.2 倍；成虫微粒体的细胞色素 P450 和 NADPH 细胞色素 P450 还原酶含量很低，几乎未检测出。用对-硝基苯甲醚和艾氏剂为底物测定 P450 酶系活性表明，与 6 龄幼虫相比，蛹和成虫具有极低的单加氧酶活性，其 O-脱甲基酶活性未检出，艾氏剂环氧化酶活性比幼虫低 2～3 个数量级。

关键词：棉铃虫；P450 单加氧酶；生长发育表达

中图分类号：Q965.9　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2001）02-0142-06

作为全变态昆虫，棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 一生经历卵、幼虫、蛹、成虫 4 个发育阶段，表现为 4 种不同虫态。不同虫态的棉铃虫所处的生活环境迥异，其抵御外来化学压力的方式可能不同。鳞翅目昆虫大多以幼虫取食为害，其 P450 酶系在幼虫期的生长发育表达受到重视[1~4]，而有关蛹、成虫、卵等虫态的 P450 酶系特征报道较少。为揭示对外来物质起重要作用的 P450 酶系在棉铃虫不同发育阶段的表达规律，我们比较研究了幼虫、蛹、成虫 3 个时期的棉铃虫微粒体 P450 酶系特征。

1 材料和方法

1.1 化学试剂

NADPH、NADH（＞98%）、DTT（1,4 -Dithiothreitol，＞97%）为 B. M 产品，牛血清白蛋白（BSA）购自 Sigma 公司，PMSF（phenylmethylsulfonyl fluoride）为 Serva 产品，Aldrin，Dieldrin（＞99%）为 RIEDEL-DEHAENAGSEELZE-HANNOVER 生产，PTU（phenylthiourea）等其它试剂为国产分析纯。

1.2 试虫

棉铃虫为室内种群，虫源由本所吴坤君研究组友好赠送。饲养环境为（25±1）℃，光照

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39670491）
收稿日期：1998-11-19；接受日期：1999-04-16

昼:夜为 14:10，人工饲料喂养[5]。幼虫为 6 龄 3 日龄，蛹为化蛹 3～5 天，成虫羽化 2 日内，未经取食。

1.3　微粒体制备

参考 Lee 与 Scott[6]方法，棉铃虫幼虫（体重平均 400 mg 左右）在 1.15% 的 KCl 溶液中解剖，中肠在去除内含物洗净后置匀浆缓冲液（HB：0.1 mmol/L 磷酸钠缓冲液 pH 7.5，含 1 mmol/L EDTA，0.1 mmol/L DTT，1 mmol/L PTU，1 mmol/L PMSF，10% glycerol），幼虫脂肪体、蛹、成虫腹部直接置于 HB 中。用全玻璃匀浆器匀浆，匀浆液经 4 层纱布过滤后在10 000×g离心力下离心 15 min（Beckman J2-MC 高速离心机），上清液过滤后，再在100 000×g下离心 1 h（Hitachi CP-70 超速离心机），将微粒体沉淀在悬浮缓冲液（RB：0.1 mol/L磷酸钠缓冲液 pH 7.5，1 mmol/L EDTA，0.1 mmol/L DTT，1 mmol/L PMSF，20% glycerol）中再悬浮作酶源。

1.4　酶分析

1.4.1　P450 含量测定：参考 Omura 与 Sato[7]方法，结合 Kulkarni 和 Hodgson[8]及 Jefcoate[9]等指出的注意要点，以下述方法进行。将微粒体悬浮液稀释至 1 mg/mL 左右，一分为二，分别加入参比杯和样品杯中，待基线平稳后，在样品杯中通 CO 1 min，再在参比杯和样品杯分别加入约 2 mg 连二亚硫酸钠，平衡 5 min 后，在波长 400～500 nm 扫描（Beckman DU-650），记录 CO 差光谱，以 $\Delta OD_{(450-490)} = 91$ 为毫摩尔消光系数，计算 P450 含量。

1.4.2　细胞色素还原酶活性测定：主要参考 Capdevila 等[10]及 Feng 等[11]方法，反应体系包括 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液（pH=7.8），0.5 mg/mL 细胞色素 C，40～100 μg 微粒体蛋白，用 0.1 微摩尔 NADPH 启始反应，在 30℃ 下动态记录光吸收（OD_{550}）变化 3 min，以毫摩尔消光系数=21.1 来计算细胞色素 C 被还原的量。

1.4.3　O-脱甲基活性测定：参考 Hansen 和 Hodgson[12]、Shang 和 Soderlund[13]等方法，反应体系的总体积为 2 mL，含 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液（pH = 7.8），0.36 mmol/L NADPH，1.5% BSA，3 mmol/L 对-硝基茴香醚（30 μL 乙醇液），0.5 mL 微粒体酶液或 1.0 mL 粗酶液。在 25℃ 振荡温育 30 min 后，用 0.5 mL 1.0 mol/L HCl 终止反应，加入 2.5 mL 三氯甲烷萃取产物，离心分层后，取 1.5 mL 三氯甲烷层，加入等体积的 0.5 mol/L NaOH 溶液反提取产物，将 NaOH 层在 400 nm 波长比色，以 0.5 mol/L NaOH 溶液为空白，以对-硝基酚作标准曲线，定量反应产物对-硝基酚的量。

1.4.4　艾氏剂环氧化活性测定：参考 Lee 和 Scott[6]方法，1 mL 反应体系中包括：0.1 mL 酶液，0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液（pH=7.8），0.36 mmol/L NADPH。用 5 μL 艾氏剂（4 mg/mL，乙醇液）启始反应，在 25℃ 反应 10～15 min 后，用 2 mL 的冷石油醚（60～90℃）终止反应并提取产物狄氏剂，石油醚相经无水硫酸钠脱水后，用于气相色谱分析。

色谱条件：ECD 检测器，毛细柱：BPX-50，30 m×0.35 mm；膜厚 0.5 μm。固定液：50% Phenyl（equiv.）PolysiLphenylene。进样口温度：250℃。柱温 230℃，检测器温度：300℃。柱流量：3.03 mL/min，该条件样品保留时间为 6.3 min，最小检出量为 1.0 ng/mL。

1.5　蛋白含量测定

Bradford[14]方法，以 BSA 为标准。

2 结果与分析

2.1 酶系组成的比较

从表 1 中可以看到，P450 含量中肠最高，蛹其次，而成虫 P450 含量很低（ΔOD = 0.0054）。酶系的另一主要成分，细胞色素 P450 还原酶表现出同样的趋势。蛹与 6 龄幼虫脂肪体比较，其 P450 含量相当，但细胞色素 P450 还原酶水平，蛹要显著低于幼虫脂肪体。

2.2 酶系活性的比较

从不同发育阶段棉铃虫 P450 酶系表达的活性来看（表 2），与幼虫比较，蛹和成虫表现出极低的活性。

表 1 不同发育阶段棉铃虫 P450 酶系成分比较

Table 1 P450 content and NADPH-cytochrome P450 reductase activity of microsomes from 6th instar larva，pupa and adult of the cotton bollworm

	幼虫中肠 Midgut of larva	幼虫脂肪体 Fatbody of larva	蛹 Pupa	成虫 Adult
细胞色素 P450 cytochrome P450（nmol/mg）	0.687 ± 0.045	0.220 ± 0.021	0.192 ± 0.017	0.060 ± 0.003
NADPH-Cyt P450 还原酶* NADPH P450 reductase	71.35 ± 28.03	31.05 ± 9.80	7.32 ± 3.12	未检测到 undetectable

* nmol/（min·mg）

表 2 不同发育阶段棉铃虫的 P450 酶系活性（nmol /（mg·min））

Table 2 P450 monooxygenase activity of microsomes from 6th instar larva，pupa and adult of the cotton bollworm

	幼虫中肠 Midgut of larva	幼虫脂肪体 Fatbody of larva	蛹 Pupa	成虫 Adult
O-脱甲基活性 O-demethylation of *p*-nitroanisole	3.32 ± 0.28	2.30 ± 0.80	未检测到 undetectable	未检测到 undetectable
艾氏剂环氧化活性 aldrin epoxidation	6.88 ± 1.52	2.35 ± 0.45	(18.35 ± 1.97)$\times 10^{-3}$	(7.17 ± 0.58)$\times 10^{-3}$

3 讨论

昆虫 P450 酶系活性在不同发育阶段或同一发育阶段的不同时期可能有较大的不同[15]，高活性往往与活跃取食阶段相联系[16]。本研究结果显示成虫 P450 含量、细胞色素 P450 还原酶活性都极低，其 O-脱甲基活性以及艾氏剂环氧化活性也远低于 6 龄幼虫。这种活性表现合乎通常的一种论点，即 P450 酶系活性与昆虫接触外源物质的程度相关[17,18]。棉铃虫成虫与幼虫虽然都是活跃取食阶段，但具有迥然不同的获取营养的途径，棉铃虫幼虫取食多种寄主植物，经常接触寄主植物中的各种次生物质，而大多数次生化合物对棉铃虫的生长发育是不利的，为有利生存，幼虫需要有效的解毒能力，表现出高的 P450 酶系活性。而成虫以花蜜等

相对无毒物质为食，解毒代谢失去意义，棉铃虫成虫的 P450 低活性体现出其“节约”的进化策略。在其它鳞翅目昆虫中成虫缺少可检测的 P450 酶系活性也有所报道[15,19,20]。

成虫与幼虫微粒体 P450 酶系活性的表现可能因昆虫种群和酶活性测定的底物不同而有所不同。Leonova 及 Slynko[21]比较了棉铃虫 6 龄幼虫和成虫微粒体 P450 酶系活性，发现 6 龄幼虫 P450 含量是成虫的 3 倍，苯并芘羟基化作用成虫比幼虫高（8 倍），而对-硝基苯甲醚及 O-脱甲基酶活性无差异。对成虫表现出较高活性作者没有作出任何讨论。Kirby[17]等研究了烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 不同种群幼虫和成虫的 MFO 活性，发现不同种群间成虫 P450 酶系活性相似而在幼虫期则有差异，同一种群的成虫与幼虫的 P450 酶活性成虫大于幼虫[2]。本研究的结论与 Leonova 和 Shynko，Kirby 等不一致，可能有材料方面的原因。我们报道的是以羽化 2 日内未经取食的成虫为材料的研究结果，至于经食物刺激及不同日龄的成虫 P450 活性的变化还有待进一步的研究。

蛹不从外界物质摄取食物，接触外源物质的程度最低，从理论上说不应具备任何解毒的 MFO 活性，本研究结果表明蛹期存在一定含量的 P450 和细胞色素 P450 还原酶，表现出比成虫更强的艾氏剂环氧化酶活性。值得注意的是蛹期棉铃虫的 P450 含量与 6 龄幼虫脂肪体的接近，是否预示蛹期 P450 是幼虫脂肪体 P450 在蛹期的遗留？同时注意到蛹虽然与幼虫脂肪体 P450 含量相当，但其 O-脱甲基活性和艾氏剂环氧化活性却比脂肪体组织低得多，这是否预示蛹期 P450 酶系主要起对内源性物质代谢的功能？蛹虽然处在不吃不动，但内部可能在为发育为成虫进行复杂的生理活动，不能排除其 P450 酶系担当生理物质的代谢作用的可能性。P450 酶系另一组成成分的 NADPH-细胞色素 P450 还原酶水平的降低而改变 P450 与 NADPH-P450 还原酶的比例也可能是蛹期酶系活性低的原因。谭维嘉等[4]比较了不同龄期去头幼虫和蛹的艾氏剂环氧化活性提出，随龄期增大，艾氏剂环氧化酶活性降低，6 龄幼虫与蛹比较，前者是蛹的 1.3 倍，也表现为幼虫＞成虫。有关蛹期 P450 酶系的报道极少，没有更多可用于比较的研究资料，但这方面的工作无疑是对昆虫作全面了解不可或缺的内容。

近年来 Wang 与 Hobbs[22]从幼虫中分离鉴定了棉铃虫第 1 个 P450 基因 *CYP6B2*，Ranasinghe[23]对 *CYP6B2* 基因表达的生长发育进行了研究。发现 *CYP6B2* mRNA 在卵内未检出，在未接触食物的 1 龄幼虫中含量极低，随龄期的增大，*CYP6B2* mRNA 含量一直上升直至 5 龄幼虫，而在蛹和成虫期未检测出，这与本研究的结果（除蛹以外）有较好的一致性。

抗性问题给棉铃虫的防治带来了极大的困难，着眼成虫控制是近年来我国棉铃虫防治的一项得力措施，成虫昼伏夜出但却是活动虫态，为化学防治提供了另一环节。在泰国，有采取夜间自动喷雾技术兼防幼虫与成虫的成功例子[21]。微粒体 P450 酶系的主要功能是对杀虫剂等外源物质的代谢，揭示成虫 P450 酶系特征与功能对于评估化学防治成虫的可行性意义十分重大。本项工作显示成虫具有极低的 P450 酶系成分含量和活性，推测它对杀虫剂的耐受能力较低，可能成为化学防治的有效靶标。当然在实际操作中，还要考虑到用模式底物测定的 P450 酶系活性的大小并不一定与昆虫对杀虫剂的耐受性直接正相关[17,21]，成虫 P450 酶系的活性也可能因种群或日龄而有所不同。

致谢　实验中得到赵文芳、陈志强同志的帮助，谨此致谢。

参 考 文 献（References）

[1] Krieger R I，Wilkinson C F. Microsomal mixed-function oxidase in insects: Ⅰ. Localization and properties of an enzyme system affecting aldrin epoxidation in larvae of the southern armyworm (*Prodenia eridania*). Biochem. Pharmacol.，1969，18：1 403～1 415

[2] Anderson R S. Aryl hydrocarbon hydroxylase in an insect，*Spodoptera eridania* (CrMER). Comp. Biochem. Physiol.，1978，59：87～93

[3] Thongsinthusak T，Krieger R I. Dihydroisodrin hydroxylation as an indicator of monooxygenase capability of black cutworm *Agrotis ypsilon* and cabbage looper *Tricoplusia ni* larvae. Comp. Biochem. Physiol.，1976，54：7～12

[4] 谭维嘉，杨雪梅，郭予元. 寄主植物对棉铃虫生理代谢的影响. 见：何礼远主编. 植物病害生物学研究进展. 北京：中国农业科技出版社，1995. 100～101

[5] Wu K J，Gong P Y. A new and practical artificial diet for the cotton bollworm. Entomologia Sinica，1997，4 (3)：227～282

[6] Lee S S T，Scott J G. An improved method for preparation，stabilization and storage of housefly (Diptera：Muscidae) microsomes. J. Econ. Entomol.，1989，82 (6)：1 559～1 563

[7] Omura T，Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. Ⅰ. Evidence for its heme-protein nature. J. Biol. Chem.，1964，239：2 370～2 378

[8] Kulkarni A P，Hodgson E. Microsomal cytochrome P450 from the housefly，*Musca domestica*：assay and spectral characterization. Insect Biochem.，1975，5：679～696

[9] Jofcoate C R. Measurement of substrate and inhibition binding to microsomal cytochrome P450 by optical-difference spectroscopy. In：Fleischer S，Pakler L eds. Methods in Enzymology. vol. 52，part C. NewYork：Academic Press，1976. 258～279

[10] Capdevila J，Merello A，Perry A S *et al*. Effect of phenobarbital and naphthalene on some of the components of the electron transport system and the hydroxylation activity of housefly microsomes. Biochemistry，1973，12 (7)：1 445～1 451

[11] Feng R，Houseman J G，Downe A E R. Effect of ingested meridic diet and corn leaves on midgut detoxification processes in the european corn borer，*Ostrinia nubilalis*. Pestic. Biochem. Physiol.，1992，42：203～210

[12] Hansen L G，Hodgson E. Biochemical characteristics of insect microsomes：N- and O-demethylation. Biochem. Pharmacol.，1971，20：1 569～1 572

[13] Shang C，Soderlund D M. Monooxygenase activity of tobacco budworm (*Heliothis virescens* F.) larvae：tissue distribution and optimal assay conditions for the gut activity. Comp. Biochem. Physiol.，1984，7913：407～411

[14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem.，1976，72：248～252

[15] Wilkinson C F，Brattsten L B. Microsomal drug metabolizing enzymes in insects. Drug Metab. Rev.，1972，1：153～228

[16] Hodgoson E. Microsomal mono-oxygenases. In：Kerkut G A，Gilbert L I eds. Comprehensive Insect Physiology，Biochemistry and Pharmacology. Oxford：Pergamon Press，1985. 225～321

[17] Kirby M L，Young R J，Ottea J A. Mixed-function oxidase and glutathione S-transferase activities from field-collected larval and adult tobacco budworms，*Heliothis virescens* (F.). Pestic. Biochem. Physiol.，1994，49：24～36

[18] Brattesten L B. Biochemical defense mechanisms in herbivores against plant allelochemicals. In：Roshenthal G A，Janzen D H eds. Herbivorous. New York：Academic Press，1979. 200～262

[19] Wilkinson C F. Role of mixed function oxidase in insecticide resistance. In：Georghoiu G P，Saito M eds. Pest Resistance to Pesticides：Challenge and Prospects. New York：Plenum Press，1983. 175

[20] Lindroth R L. Differential toxicity of plant allelochemicals to insects：role of enzymatic detoxication systems. In：Bernays E ed. Insect-Plant Interactions. vol. 3，Boca Raton F L：CRC Press，1991. 1～18

［21］ Leonova N I，Slynko N M. Comparative study of insecticide susceptibility and activities of detoxification enzymes in larvae and adults of cotton bollworm，*Heliothis armigera*. Arch. Insect Biochem. Physiol.，1996，32：157～172
［22］ Wang X P，Hobbs A A. Isolation and sequence analysis of a cDNA clone for pyrethroid inducible cytochrome P450 from *Helicoverpa armigera*. Insect Biochem. Molec . Biol.，1995，25：1 001～1 009
［23］ Ranasinghe C，Headlam M，Hobbs A A. Induction of the mRNA for *CYP6B2*，a pyrethroid inducible cytochrome P450，in *Helicoverpa armigera*（Hübner）by dietary monoterpenes. Arch. Insect Biochem. Physiol.，1997，34：99～109

Comparison of components and activities of microsomal P450 monooxygenases from the cotton bollworm，*Helicoverpa armigera* during different developmental stages

QIU Xing-hui，LI Wei，LENG Xin-fu
（State Key Laboratory of Intergrated Management of Pest Insects and Rodents，Institute of Zoology，the Chinese Academy of Sciences，Beijing　100080，China）

Abstract：The components and activities of microsomal P450 monooxygenases in 6th instar larva，pupa and adult were examined. The results showed that the levels of P450 and NADPH-P450 reductase were in the order of 6th instar larval midgut＞pupae＞adults. The contents of cytochrome P450 in pupa was similar to that in 6th instar larval fatbody，while the level of NADPH-cytochrome P450 reductase in the former was only about quarter as much as that in the latter. In adult microsome，the two components were undetectable. Compared with 6th instar larvae，the assayed activities were much lower in adult and pupa：the *p*-nitroanisole demethylation was undetectable and aldrin epoxidation was 10^{-3} fold as that in 6th instar larva.

Key words：*Helicoverpa armigera*；cytochrome P450 monooxygenase；developmental expression